

黑尾叶蝉卵黄原蛋白受体基因 cDNA 的克隆、序列分析及表达模式

陈利鹏, 杜玉萍, 方琦, 姚洪渭, 叶恭银*

(浙江大学昆虫科学研究所, 农业部农业昆虫学重点实验室, 杭州 310058)

摘要:【目的】卵黄原蛋白受体(vitellogenin receptor, VgR)属于低密度脂蛋白受体,通过介导内吞作用为发育中的卵母细胞摄取卵黄原蛋白,为胚胎发育提供营养物质,在昆虫生殖过程中发挥关键作用。为研究黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* VgR (NcVgR) 基因的生理功能及其在生殖中的作用,本研究克隆并解析了 NcVgR 基因的序列,并对其时空表达进行了研究。【方法】根据黑尾叶蝉转录组数据信息,利用 RT-PCR 克隆了 NcVgR 基因,并进行了生物信息学分析;利用实时荧光定量 PCR 研究了不同发育时期、成虫不同组织 NcVgR 的表达水平。【结果】NcVgR cDNA 序列全长 6 676 bp, 开放阅读框长度 5 568 bp, 编码 1 855 个氨基酸, 预测编码蛋白的分子量为 206 kD, N 端前 17 个氨基酸为信号肽。序列分析显示, NcVgR 具有低密度脂蛋白家族的 5 个经典保守域, 即: 配体结合域 (ligand-binding domain, LBD)、表皮生长因子前体同源域 (EGF-precursor homology domain, EGFP)、O-糖链结构域 (O-linked sugar domain, OLSD)、跨膜域 (transmembrane domain, TMD) 和胞质尾域 (cytoplasmic domain)。系统发育分析表明, NcVgR 与褐飞虱 *N. lugens* VgR 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果显示, NcVgR 转录起始时间为 5 龄若虫, 羽化后转录水平逐渐上升, 至羽化后 8 d 达到峰值, 随后下降。有意思的是, 随着黑尾叶蝉产卵, NcVgR 转录水平再次上升, 至羽化后 16 d 达到最高水平。组织定位结果显示, NcVgR 在黑尾叶蝉雌成虫卵巢中特异性高表达, 而在雌成虫脂肪体和肠道中微量表达, 在雌成虫脑及雄成虫中均未检测到表达。【结论】NcVgR 在黑尾叶蝉雌成虫卵巢中特异性表达, 并且不同发育时期具有不同的表达量, 这为研究黑尾叶蝉的生殖调控机理提供了分子信息。

关键词: 黑尾叶蝉; 卵黄原蛋白受体; 基因克隆; 序列分析; 表达模式

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)09-0925-13

Molecular cloning, sequence analysis and expression profiling of vitellogenin receptor gene in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae)

CHEN Li-Peng, DU Yu-Ping, FANG Qi, YAO Hong-Wei, YE Gong-Yin* (Key Laboratory of Agriculture Entomology, Ministry of Agriculture, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: 【Aim】Vitellogenin receptor (VgR), which belongs to low-density lipoprotein receptor (LDLR) superfamily, mediates vitellogenin/yolk protein absorption by developing oocytes for embryonic development and plays a critical role in insect reproduction. In order to define the physiological functions of VgR and its roles in reproduction of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, we cloned and characterized the VgR gene (NcVgR), and monitored its expression profiles. 【Methods】NcVgR was cloned using RT-PCR according to previous transcriptomic data of *N. cincticeps* and analyzed by bioinformatic

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(“973”计划)项目(2014CB138404)

作者简介: 陈利鹏, 男, 1991 年 11 月生, 湖南永州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化, E-mail: clpzju@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: chu@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-06-28; 接受日期 Accepted: 2016-08-29

tools, and the mRNA levels of *NcVgR* in different developmental stages and adult tissues were detected via real-time PCR. 【Results】 The complete cDNA of *NcVgR* is 6 676 bp in length with a 5 568 bp of open reading frame, encoding a 206 kD protein with 1 855 amino acids including a putative 17-amino-acid signal peptide at the N-terminus. *NcVgR* has 5 typical conserved domains of LDLR family, including ligand-binding domain (LBD), EGF-precursor homology domain (EGFP), O-linked sugar domain (OLSD), transmembrane domain (TMD) and cytoplasmic domain. Phylogenetic tree analysis indicated that *NcVgR* was most closely related to *N. lugens* VgR. Real-time PCR results showed that the expression of *NcVgR* started at the 5th instar nymphal stage, increased rapidly after adult eclosion, reached the peak at 8 d post adult eclosion, and decreased subsequently. Interestingly, the transcriptional level of *NcVgR* increased again and reached the peak at 16 d post adult eclosion when *N. cincticeps* female adults started to lay eggs. The mRNA level of *NcVgR* was very specially high in ovary, but only trace level was measured in fat body and gut of female adults. *NcVgR* was not expressed in both brains of female and male adults. 【Conclusion】 We cloned the *NcVgR* gene, and demonstrated that it is specifically expressed in ovaries of female adults and displays a higher expression after adult eclosion. Our results provide the molecular information for further studying the regulation mechanisms of reproduction of female *N. cincticeps*.

Key words: *Nephotettix cincticeps*; vitellogenin receptor (VgR); gene cloning; sequence analysis; expression profile

昆虫卵黄原蛋白受体 (vitellogenin receptor, VgR) 在雌成虫成熟卵巢中表达, 锚定在生殖细胞膜表面, 在卵子发生过程中, 通过介导内吞作用将脂肪体合成、分泌到血淋巴中的卵黄原蛋白转运进入正在发育的卵母细胞中, 为胚胎发育提供营养, 在昆虫卵子形成及卵黄发生中发挥重要作用 (Sappington and Raikhel, 1998; Tufail and Takeda, 2008, 2009)。因此, 开展 VgR 的研究不仅有助于了解昆虫生殖生理机制, 对于害虫的防治及益虫的繁殖也具有重要意义。迄今, VgR mRNA 序列已经在不少昆虫中先后报道, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Schonbaum *et al.*, 1995)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Sappington *et al.*, 1995)、红火蚁 *Solenopsis invicta* (Chen *et al.*, 2004)、家蚕 *Bombyx mori* (林英等, 2005)、美洲大蠊 *Periplaneta americana* (Tufail and Takeda, 2005)、德国小蠊 *Blattella germanica* (Ciudad *et al.*, 2006)、马德拉蜚蠊 *Leucophaea maderae* (Tufail and Takeda, 2007)、西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Shu *et al.*, 2011)、柞蚕 *Antheraea pernyi* (Liu *et al.*, 2011)、烟粉虱 *Bemisia tabaci* (程璐等, 2013)、褐飞虱 *N. lugens* (Lu *et al.*, 2015)、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Cong *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015)、野桑蚕 *Bombyx mandarina* (Qian *et al.*, 2015) 等, 部分昆虫 VgR 序列已经上传到 GenBank,

还有 3 种昆虫 VgR 获得了基因组序列, 即西方蜜蜂 *A. mellifera*、丽蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Tufail and Takeda, 2009)。此外, 双翅目环裂亚目黑腹果蝇 *D. melanogaster*、桔小实蝇 *B. dorsalis* 和家蝇 *Musca domestica* 等昆虫卵黄多肽 (yolk peptides, YP) 在进化上与卵黄原蛋白 (vitellogenin, Vg) 完全不相关, 而其卵黄多肽受体 (YP receptor, YPR) 却与其他昆虫 VgR 同源 (Bowne, 1992; Tufail and Takeda, 2008, 2009)。

昆虫 VgR 是由约 7.5 kb 的转录本编码的 180 ~ 215 kD 的大分子膜蛋白 (Tufail and Takeda, 2009)。埃及伊蚊 *A. aegypti* VgR 大小约 205 kD, 天然状态下以非共价同源二聚体形式存在, 不包含小亚基 (Sappington *et al.*, 1995)。昆虫 VgR 属于低密度脂蛋白受体, 与载脂蛋白受体 (lipophorin receptor, LpR)、LDLR 相关蛋白 (LDLR-related protein, LRP)、更低 LDLR (very LDLR, VLDLR)、巨蛋白 (megalin) 等一起构成低密度脂蛋白受体家族, 该家族蛋白具有 5 个经典保守域: 配体结合域 (ligand-binding domain, LBD)、表皮生长因子前体同源域 (EGF-precursor homology domain, EGFP)、O-糖链结构域 (O-linked sugar domain 或 O-linked carbohydrates, OLSD)、跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 和胞质尾域 (cytoplasmic domain) (Tufail and

Takeda, 2009)。这 5 个经典保守域各自具有相应的功能,配体结合域介导受体与配体的结合;表皮生长因子前体同源域介导受体与配体在酸性条件下解离;O-糖链功能域功能尚不清楚,可能与受体的延伸有关;跨膜结构域富含疏水性氨基酸,将受体锚定在质膜上;胞质尾域含有内化信号(internalization signal) LI 和 NPXY,将受体导向包被小泡(Sappington and Raikhel, 1998; Tufail and Takeda, 2009)。受体介导的内吞作用过程在埃及伊蚊中充分展示(Snigirevskaya *et al.*, 1997),但是 VgR 转运 Vg 的分子机制目前还没有报道。

在对 VgR 功能进行研究时,发现黑腹果蝇 *D. melanogaster* VgR 基因发生突变时,导致卵母细胞无法累积 YP,雌性不育(Schonbaum *et al.*, 1995)。利用 RNAi 对德国小蠊 *B. germanica*、红火蚁 *S. invicta*、斜纹夜蛾 *S. litura*、桔小实蝇 *B. dorsalis*、野桑蚕 *B. mandarina*、褐飞虱 *N. lugens* 和希伯来花蜱 *Amblyomma hebraeum* 等 VgR 进行干扰,导致 Vg 在血淋巴中大量累积、卵巢发育缓慢和雌性不育等(Ciudad *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2011; Smith and Kaufman, 2013; Cong *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2015)。家蚕 *B. mori* VgR 发生突变,Vg 和 30 kD 蛋白不能进入卵巢,只能产下白色且相对较小的卵(Lin *et al.*, 2013)。这表明 VgR 在营养转运、卵的形成及胚胎发育过程中具有重要的作用,可能成为害虫防治的潜在靶标。另外,一些虫传病原菌还能借助 VgR 介导的内吞作用打破卵巢屏障,进入卵巢,完成经卵传播。如,灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 传播水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)模型中,RSV 能够与 Vg 在卵巢外结合,一起通过受体介导的内吞作用进入卵巢(Huo *et al.*, 2014)。黑腹果蝇 *D. melanogaster* VgR 发生突变,可有效抑制其内共生菌 *Spiroplasma poulsonii* 进入卵巢,导致内共生菌在血淋巴中大量累积(Herren *et al.*, 2013)。沉默变异革蜱 *Dermacentor variabilis* VgR,其携带的巴贝西虫 *Babesia* 不能进入卵巢(Boldbaatar *et al.*, 2008)。由此可见,VgR 是研究病原微生物经卵传播机制的关键因子。

黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* (Uhler) 属于半翅目(Hemiptera)叶蝉科(Cicadellidae),是东亚温带稻区重要害虫,不仅通过直接取食为害水稻韧皮部,还能传播多种植物病毒,如水稻东格鲁球状病毒、水稻矮缩病、黄矮病、黄萎病等,给水稻生产带来重大损

失(Fujita *et al.*, 2006; 阮义理等, 1985)。已有研究表明,水稻矮缩病毒(rice drawf virus, RDV)经黑尾叶蝉卵的传播率高达 85% (Fukushi *et al.*, 1962),且经与黑尾叶蝉互作而提高黑尾叶蝉的产卵量,不仅有利于害虫发生,还能促进病毒的流行(梁莉等, 2010)。目前大量稻区黑尾叶蝉已经对杀虫剂产生了抗性,急需发展高效环境友好型的抗虫新技术(陈巧云等, 1978; Fujita *et al.*, 2006)。因此,本研究克隆了黑尾叶蝉 VgR 基因 *NcVgR* 的 cDNA 全长序列,并对其序列及表达模式进行了分析,为深入揭示 RDV 促进黑尾叶蝉产卵的生殖调控机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与植物

1.1.1 供试昆虫:黑尾叶蝉采集于浙江大学紫金港西区试验田(杭州),集中在养虫笼中,在室内用水稻 TN1 饲养。饲养条件:温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 $75\% \pm 5\%$,光周期 14L: 10D,光强度 $3\ 500 \sim 4\ 000\ \text{lx}$ 。

1.1.2 供试水稻:供试水稻品种为 TN1。小苗获取:将收获的水稻种子浸在水中,去除漂浮秕种,放置在 37°C 培养箱内,每 12 h 换一次水,2~3 次后观察水稻是否露白,如已露白,将水倒掉后放回培养箱,2 d 后,放到培养架中继续培养,10 d 后,长至株高约 10 cm,可用来作为小苗来饲养黑尾叶蝉。大苗获取:用海绵条(长 5~10 cm,宽 2 cm)将 10 cm 高的水稻小苗从根部以上裹住,塞进事先打好孔的泡沫板中,泡沫板漂浮于塑料箱中,用木村 B 培养液(Yoshida *et al.*, 1976)培养 30 d,可用于实验。

1.2 试剂及来源

TRIzol Reagent 购于 Invitrogen 公司;EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、Trans2K Plus DNA Marker、PCR 试剂盒、pGEM[®]-T Easy Vector System I 及感受态细胞均购于北京全式金生物公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Perfect Real Time 购于 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购于 Axygen 公司;引物由上海生工生物公司合成。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

TRIzol 法提取羽化后 10 d 黑尾叶蝉雌成虫总 RNA,使用反转录试剂盒去除基因组 DNA,合成第一链 cDNA。

1.4 基因扩增

根据转录组数据筛选序列,用 Primer Primier 5 设计引物,克隆 *NcVgR* 全长,引物见表 1。以上述合成 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,程序:94℃, 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 8 min, 35 个循环; 72℃, 5 min; 4℃ 保存。

1.5 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定, DNA 凝胶回收试剂盒纯化后,用 pGEM®-T Easy Vector System I 进行 TA 克隆;从蓝白斑筛选平板中挑选单个白色菌落扩大培养,M13 引物筛选阳性克隆,送由铂尚公司测序。

表 1 基因克隆及实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers used for gene cloning and real-time PCR

引物用途	引物名称	引物序列(5'-3')
Use of primers	Primer name	Primer sequences
cDNA 克隆	NcVgR-SP1	GATGGCCTAGTCTGCAATCCAAAT
	NcVgR-API	TCGGTTCAAACCTAAGCTAAAATG
荧光定量 PCR	NcVgR-SP2	GCCAATACCTACAGTTGCGG
	NcVgR-AP2	CCACGGCTTGATCATCTGTG
	Nc28S-SP	TCACGATGTCAGTTTGAGG
Real-time PCR	Nc28S-AP	CCTCTCTCGCAATGAGAAC

1.6 序列分析、多序列比对和进化树构建

使用序列在线工具包 ([http://www. bio-soft. net/sms/index. html](http://www.bio-soft.net/sms/index.html)) 中序列翻译工具翻译序列; SignalP 4. 1 Server (<http://www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/>) 查找信号肽; NCBI 上 conserved domains 查找保守序列; 跨膜域分析 (<http://www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM/>); Clustal X 1. 83 进行全序列比对; MEGA 5. 05 软件中的邻接法构建进化树,系统树中每个分枝的统计学显著性分析以 bootstrap 进行检验,重复次数为 1 000 次。

1.7 NcVgR 的时空表达

分别取卵、4 龄若虫、5 龄若虫、羽化后 0 - 20 d 雌成虫以及羽化后 10 d 左右雌成虫脂肪体、卵巢、肠道和脑以及雄成虫提取总 RNA,取 1 μg 总 RNA 反转录合成 cDNA, Primer 3 在线设计定量引物 (<http://primer3. ut. ee/>)。以 cDNA 为模板, 28S rRNA (GenBank 登录号: AY830701) 为内参,使用定量试剂盒检测 *NcVgR* 的表达量。扩增条件:95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 39 个循环。

1.8 数据统计与分析

在 Excel 软件中使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算不同时期、不同组织 *NcVgR* 的 mRNA 相对表达水平 (Livak and Schmittgen, 2001)。不同样本或处理之间的差

异比较采用 ANOVA 法,在 DPS (version 14. 50) 软件上进行统计分析 ($P \leq 0. 05$, Tukey 氏多重比较) (Tang and Zhang, 2013)。

2 结果

2.1 NcVgR 基因克隆及序列分析

根据黑尾叶蝉转录组数据中筛选到 VgR 序列设计引物,并进行 PCR 扩增,结果如图 1。黑尾叶蝉卵黄原蛋白受体基因 *NcVgR* 全长 6 676 bp (GenBank 登录号: KX022098), 开放阅读框长度 5 568 bp (图 2), 5' 端非编码区 199 bp, 3' 端非编码区 909 bp, 编码氨基酸 1 855 个, 其中 271 个强酸性氨基酸, 520 个疏水性氨基酸, 571 个极性氨基酸。预测编码蛋白大小 206 kD, pI 为 4. 9。N 端第 1 - 17 位氨基酸为信号肽, 剪切位点位于第 17 个残基苏氨酸和第 18 位残基苯丙氨酸之间。14 个糖基化位点 (NXS 或 NXT)。跨膜域分析显示第 1710 - 1732 位氨基酸为跨膜域, 第 1 733 - 1 855 位氨基酸为胞质尾域, 其余部分为胞外区域。NCBI 上查找保守序列的结果显示, 黑尾叶蝉的 VgR 与美洲大蠊 *P. americana*、德国小蠊 *B. germanica*、马德拉蜚蠊 *L. maderae* 的 VgR 序列一致性均为 42%, 与褐飞虱 *N. lugens* 的 VgR 序列一致性为 41%。

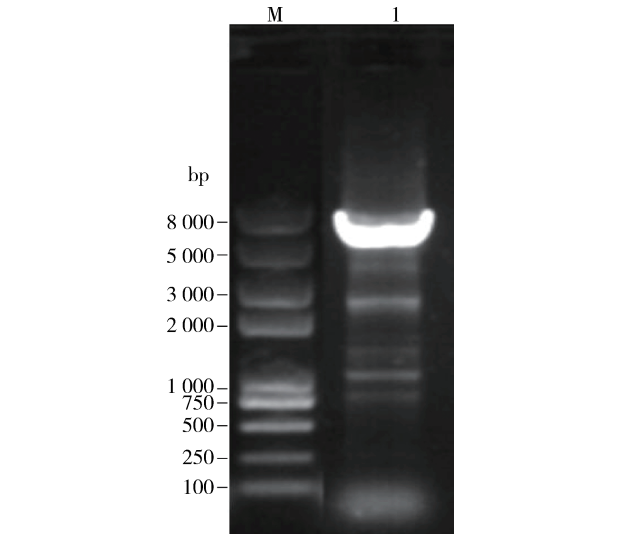


图 1 *NcVgR* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of *NcVgR* gene
M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: PCR 产物 PCR product.

2.2 NcVgR 的多序列比对及进化分析

选取褐飞虱、美洲大蠊、德国小蠊 VgR 与

NcVgR 氨基酸序列进行多序列比对(图3),从图中可以看出,昆虫 *VgR* 氨基酸序列在不同物种中高度保守,很多保守区域和保守基序的位置非常一致。*NcVgR* 基因具有5个经典功能域:配体结合域(LBD)、表皮生长因子前体同源域(EGFP)、O-糖链结构域(OLSD)、跨膜结构域(TMD)和胞质尾域(图3和4)。*NcVgR* 有两个LBD,分别含有5个和7个class A 重复域,每个class A 重复域有6个半胱氨酸残基(C)及一些保守性酸性残基,如CDxxxDCxDCSDE(加粗部分为酸性残基),半胱氨酸残基在C I-C III, C II-C V, C IV-C VI中形成二硫键。表皮生长因子前体同源域存在于配体结合域的后面,包括EGF-like 重复域(class B 模块)和用于形成 β 螺旋桨域的YWTD 基序,每个EGF-like 重复域有6个半胱氨酸重复域组成,在C I-C III, C II-C IV, C III-C VI中形成二硫键。 β -螺旋域约含260个氨基酸残基,由6个保守YWXD 基序构成。*NcVgR* 表皮生长因子同源域有两个,第1个由4个EGF-like 重复域和12个YWXD 基序构成的两个 β -螺旋域构成,第2个由3个EGF-like 重复域和6个

YWXD 基序构成的一个 β -螺旋域构成。O-糖链结构域约30个残基构成,含6个丝氨酸/苏氨酸(S/T)。跨膜结构域约24个残基组成,富含丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)和缬氨酸(V)等疏水氨基酸残基。*NcVgR* 胞质尾域位于细胞膜内部,同时含有NPAY 和LI 两种内化信号(图3和4)。

不同物种的 *VgR* 氨基酸序列构建的系统发育树如图5。从图中可以看出,昆虫与全爪螨 *Panonychus citri*、脊椎动物非洲爪蟾 *Xenopus laevis*、罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 和拟长额虾 *Pandalopsis japonica* *VgR* 形成两个明显的类群,且在昆虫 *VgR* 类群中,不同目的昆虫各自聚成小类群,这说明 *VgR* 在进化上具有很好的保守性。*NcVgR* 和半翅目昆虫 *VgR* 聚在同一个进化枝上,与褐飞虱 *N. lugens* 最为近缘。

2.3 *NcVgR* 序列的表达模式

以28S rRNA 作为内参,荧光定量PCR 检测黑尾叶蝉不同时期 *VgR* 转录水平结果如图6所示。*NcVgR* 从5龄若虫期启动转录,羽化后转录水平逐

```

1 M W K W L F A S L V V S Q Y A N T F T S A A F E K F K G S I
1 ATGTGGAAGTGGCTTTTTCGCTCTTGTGTCTCAGTACGCAACACATTACCTCAGCGGCTTTTGAAGAGTCAAAAGGCAGTATT
31 G C P P M Q Y L C M D G E C I S E E K H C D G H P D C H D G
91 GGCTGCCCTCCGATGCGACTTGTGTATGGATGGGAATGCATATCCGAGGAGAAGCACTGCGACGCGACCCGAGCTGCACGCGGA
61 D D E H N C D V L R C L P P M Y F E C A N H R C I S T T F L
181 GATGATGAACAACTGCGATGTGTGTGAGGTGTCTGCCCTCCGATGTACTTTGAGTGTGCGAAGCAAGGTGATCAGCACCACATTCTCTC
91 C D D D N D C E D S D E K N C S T H S A G E I A I S T C S
271 TGCGACGATGATAACGATTGCGAGGATTGGTCTGACGAGAAAACTGCAGCACTCACAGCGCTGGTGGATAGCGATAAGTACTTGCAGT
121 S R E F Q C L D R L C V P E N W V C D G K K P D C L D A S D E
361 TCTCGGGAGTTTCAGTGTCTCGACCGCTGTGTGCTGAGAGAACTGGGTCTGTGACGGGAAACCCGACTGTCTAGATGCCAGTGACGAG
151 T L G C S S N I S C D G F Q C K N H F C I P K E F H C D G G
451 ACCCTCGGCTCGAGCTCAATATATCGTGTGATGGATTCCAATGCAAGAACTACTTCTGTATCCCAAGAGGTTTCATTGTGATGGTGA
181 N D C G D N D E N C P S R E I T M E Q S A S L G D I A I S T C S
541 AATGATTGCGGTGACAACTCTGACGAGGAGAACTGCCCTTCAAGAGAGATAACGATGGAGCAATGTTCGTTAGATCAAGGATGTATTAC
211 C H D G I L C L E L F K V C N G I K D C L D G S D E G G R C
631 TGCCATGACGGTACTTCTGTGTCTAGAGCTTCAAAAGTCTGCAATGGTATAAAAGACTGTCTGGATGGATCAGGTGAGGTTGCTGCTGC
241 N E T G L C S N S S C P H E C F P S P N G P L C V C P R G T
721 AATGAAACCGGATGTGTTCAACTCGAGTTGTCTCCTCAGCAATGCTTCCCTCTCCCAAGCGGACCCTTTCGCTGTCTCCCAAGGGGAACC
721 V N D G H T T C Q D I N E C E A Q Y G I C D H K C T K N Y V G G F
811 GTCAATGATGGACATACTTGTCAAGATATAAATGAATGTGAGGAGTACGGAATCTGTGATCATAAGTGAAGAACTATGTTGGAGGCTTC
301 Q C V C D P G Y L L Q P D K R T C K A E G F E G L L I F S S
901 CAGTGGCTCTGCGACCCAGGCTACCTGCTCAGCCTGATAAGCGAACTTGCAAGCTGAAGGCTGAGGGTCTGCTGATCTTCTCGTCT
331 H K Q C I R A F F L T S E V Y Y P V A K D L S Q V T G V A Y D
991 CACAAGCAGATACGAGCCTTCTTCTGACATCGGAGGTGTACTACCCCGTCGCCAAGGATCTGTGCAAGTGACAGGTGTCTGCTTATGAT
361 G L H V Y W G N P L I A R S G M D G S E V F D K E V I I
1081 GGGTTGCATGTCTACTGGACCAACGTGTACCGGGGGAGGAAGCTATCATGCGAGCGGTGGAGGATGGAGTGAAGGAAGTCATCATC
391 T A G L G T P E D L A L D W V T K N I Y F T D S K F Q H L G
1171 ACAGAGGCTTAGGAACTCCAGAACCTGGCACTGGATGGGTGACCAAGAAATATTACTTACAGCACTCCAGATCCAGCTCCAGCCTGGGG
421 V C S N E G R L C T V L H N R D V D K P R G I C L S P K Q G
1261 GTGTGTTCCAAATGAGGGGAGGTTGTGTCACCGTCTCCATAATAGAGATGTGGATAAGCCATAGAGGCTGTCTCTCTCCCAAGCAAGGC
451 L M Y W S D G N P L I A R S G M D G S E V F D K E V I I
1351 CTGATGATTTGGTCAGACTGGGGAATCGTCTCTGATCGCTCGCTTGGCATGGATGGCTCGGAAGTGTGTTGACITTTGTCACCAAGAC
481 L H W P N G N L T I D H G N D R L Y W V D A K L L V I E S I K
1441 CTCCTTGGCCTTAACGGTCTAACCTGATCGATGCGCAATGATCGTCTCTACTGGGTGGATGGCAAGCTACTGGTCTATTGAGTCTATCAAA
511 L D G T D R R V V L S E A I K H P Y A V S V F E S S L Y W S
1531 CTAGATGGGACAGATAGAAGGGTGTGTTTGTGAGAACCAATCAACACCCATATGCGATATCTGTTTTGAGAGCAGCTTATCTGGAGC
541 D W T G Q E I Q K N K F T G K D R Q M V I R E I R I F
1621 GACTGGACGGGGCAGGAGATACAGAAGTGAACAAAGTTTACGGGCAAGACCGACAAATGGTTATACGAGAGAAAATAACCGCATCTTT
571 G I H I Y H P A M M N T T I H N P C L D A G C S D L C L L A
1711 GGCATACACATCTATCATCCAGCCATGATGAACACGACAACTCCACAAACCCATCTGGAGCTGGGTGCAAGTGCAGTGCCTGTGGCT
601 P K S Q R R G Y T C A C P Q D K L L A P N G H F C E R V L K
1801 CCTAAGTCCAGAGGCGTGGATACACATCGCCTCGCCCGCAGGACAAGTTGTTGGCACCCAATGGCCATTTCTGCGAGCGAGTGTCTCAAG
631 S L S L V G A G S L V G A E V E H K H L G R L T T T P I P I
1891 AGTCTCTCCTGTGTGTGGAGCTGGAAGCTCTCTAGTAGAGGTAGAGCACAAACACTTAGGGCGTCTCACAGCCACTCCGATCCCCATC
661 N N V F K I G A I A Y D G F D G H I I V F D S A D K K M V A

```

1981 AACAAATGTTTTCAGATCGGGGCTATTGCTTATGATGAGTTTGACGGTCACATAATCGTCTTGACTCGGCTGATAAGAAGATGGTAGCG
691 L D R L K G E T T V L L S G D L G K V E G M D V D P Y G H N
2071 CTGGACGAGCTGAAAGGCGAGACCAGTGTCTGCTGATTGGGGAGGTGGAGGGTATGGATGTTGACCCCTTACGGTCACAAC
721 L Y W A D T L V S D E R Q T V E V F S L N T H E R K V L H R L D F F G
2161 CTTTATTGGGCTGACTCGGAGAGGCAGACTGTGAGGTGTTCTCGTCAACACTCATGAGCGAAAGGTTCTCTGAGAGACTTCGGAGGC
751 E S P V D V A L V P D Q G F M F I A L M G P K V V H I D R F
2251 GAGAGCCCTGTGACGTGGCTCTGGTACCGGATCAAGGTTTTCATGTTTCATCGTCTCATGGGACCAAGGTGTGCATAGACAGGTTTC
781 S M D G E Q K S H V H I A E T N I L G P N V A L T Y D K N L
2341 AGCATGGACGGAGAGCAGAAGTCGCATGTGCACATTCGCCAGACCAACATTTAGGACCCCAACGCTCGCTCTCAGTACGACAAAAACCTG
811 N H I F W S D S G T G T G H I E A V D V E G M K R I K V R E L Y
2431 AACCACATCTTCTGGTCTGACTCGGGGACTGGCCACATTTGAAGCTGTTGATGTCGAAGTATGAAAAGATAAAGGTACGAGAGCTGTAT
841 H S P M D I A V V A D D I F W T N H G S A N L L W V N K F E
2521 CATTCCCAATGGATATCGCTGTGGTGTGATGATATTTCTGGACCAATCATGGATCAGCAAAATTTGCTGTGGGTCAACAAATTCGAA
871 D E A D S S K Q I K L N E T H G L E S V R L A A V T G L V A
2611 GATGAGGCAGATGACGACAAACAGATCAAGTTAAATTTTACTTGCTGGTCTGGAGTCAGTTAGTTGGCAGCAGTACCCGGTGTGGCA
901 G N D H A G C Q N N G C Q S H I C L L N P V K Q V C C T G F
2701 GGAATGACCATGCTTGCCACAGAACATATGGCGGTGACGCCACATCTGTCTATTGAATCCAGTTAAGCAGGTGTGCACCTGTCCCTTC
931 G M V L T T D G R T C E Q P K H C S V G Q Y R C T S G A C I
2791 GCGATGGTGTGACCCAGGTGCGCGGAGTGTGAGCAGCCCAAGCACTGCTCGTCCGCGCAATACCGTGCACCTCCGCGGCGTGTATC
961 P V S D R C N R R P D C P Q G D D E L D C K M F T L Q C T R
2881 CCGGTGTCTGACCGCTGCAACCGGCGCCCGACTGCCCTCAGGGTGATGACGAGCTCGACTGCAAGATGTTACCGTGCAGTGCACCCGA
991 G T F C D H E K C L E H R N R C D G T V D G T C S D E
2971 GGAACATTTCTCTGCCACGACGCGGAGAGTGCTGGAGCACCAGCAACCGCTGTGATGAACCGTAGACTGTGCGCAGCGATCCGACGAA
1021 L N C F Q E S N T C K P G E F Q C K S G P C I P M S W R C D
3061 CTCAACTGTTTCCAAGAGTCTAACACTTGCAAGCCTGGAGAGTTCCAGTGCAAGAGCGGACCTTGATCCCCGATGCTTTGGAGATGCGAT
1051 D T K D C E D E S D E Q M C E K T T C H P E R E F R C T S G
3151 GACACAAAAGACTGCGAAGATGAGTCAGACGAACAGATGTGCGAGAAAACCACTTGTCAACCCGAGAGAGAGTTTAGATGCACGACGGA
1081 T C I P S S W E C D G Q P D C S D A S D E H E I C V T G T Q N N
3241 ACCTGTATTCCATCCAGTTGGGAATGTGACGGACAGCCCGACTGTAGTGATGCGTCTGACGAGCAGAGATTGTGTTACACAGAACAAC
1111 C A A D Q L V L C N N G R C V D R Q L L V C D G R D D C E D G T
3331 TGTGCGGCGGACCGATGCTGTGTGCAACCAAGCCCGGTGTGTGACGACGACCTGGTGTGCGACGCGCGGAGCAGATTGTGAGGATGGGAGC
1141 D E V D C R E T P V T P S E E G E V P R H I D E S T S S H R
3421 GACGAAGTTGACTGTGCGAAACTCCAGTTACACCCCTCGGAGGAAGCGAAGTCCCTCGACATATTGATGAGTCAACGTCCTCCCACCGA
1171 P Q C E D T Q F V C D I C L P A E A R C N G T A H E
3511 CCCCAGTGCGAGGACACCCAGTTTGTCTGCGATATCTGCTCCCTGCTGAGGCCAGATGTAACGGGACGGCAGAGTGTGTCACGAGAGAG
1201 D E T G C T D G G C L E H Q F Q C S E T G R C I S L D W T C T D G
3601 GACGAGACCGGATGTCAGCGGCTTTTGGGACATCAGTTCCAGTGTGCGGAGACAGGAGCTGTGATCTCTAGACTGGACGTGTGACGGA
1231 A N D C G D N S D E D S T L C Q R H S G T N K A L N H G V S
3691 GCCAACGACTGGCGGACAACTCGGATGAAGACTCCACGCTGTGTGACGCCACAGCGGCACCAACAGGCTCTCAACCTGGAGSTTCC
1261 E C L E F T C K N K K L P F S K V C D G K P C D E D G S D
3781 GAGTGCTGGAGTTTCACTGCAAGAACAGAGTGTGTGCCCTTCAGCAAGGTGTGTGATGGGAAGCCGAGTTGTGAGGACGGAGCGAT
1291 E G G R C G R G K D A G C M D K C Q E T P S G P K C A R N
3871 GAGGAGGAAGATGTGGGCGAGGTTGAAGGATCAGGATATTGGACAAATGTCAGGAACCCCGAGTGGTCCCAATGCGCGCTGTTTC
1321 P G F Q L T G D S K S C A D V D E C A L G I Y C S Q F C H N
3961 CTTGGCTTCCAGCTGACGGGACAGCAAAAGTTGCGCGGATGTGACGAGTGCCTCTCGGCATCTACTGCTCTCAGTTCTGCCAAC
1351 T L G G F T C S C R Y P D Y Q L R E N R M T C K A K G N E M
4051 ACCTCGGAGGCTTCACTGCACTGCCCTGACCTGACTACCACTGCGCGAGAACCGAATGACCTGCAAGGCCAAAGCTTAATGAATG
1381 E M I F V T N N E I R Y V T N S K L G V I H K S Q A R N
4141 GAGATGATATTCGTTACCAACATGAATCCGCTATGTGACCGGATCAAGATCCAAGCTTGGGGTATTACAAGTCCCAGGCCAGGAAC
1411 F Q V S G L D V D S R K R C I Y W S S A T V G T I T R S C N
4231 TTCCAAGTATCCGTTTGGATGTGACTCTCGACTGCGGTGTATCTACTGGAGCTCAGCAACGGTGGGAACGATCACACGCTGTAAAC
1441 K N E T S M T T L V R P S K L A L D W V T E N V Y F V E R G
4321 AAGAAGCAGCTGCGATGACGACACTGGTGCGACCGAGTAAGTGTGCGTGGACTGGGTGCGGAGAACGTTTACTTTAGAGCGAGGT
1471 H V V G V K C N F N V G K C S L F A S P E V V R A S P E V T L A V
4411 CACGTGGTGAAGTCTGCAACTTCAATGTGGGCAAGTGTTCGGTCTGTGTCAGGGCGTCACCCGAGGTCTCCATCGACACTCTCGCGGTT
1501 D P L K K L M F W S E S T G L G E V K S V L K R A D M S S G G
4501 GATCCACTCAAGAAGCTAATGTTCTGGAGTGAGAGCAGCGGACTGGGAGAAGTGAAGAGCTATTGAAGCGAGCTGACATGTCCGGTGGC
1531 S V T V V L D D G L Y R V T D I A L D P L H Q Q L V Y W L D A
4591 TCGGTGACTGTGCTGACGACCGGCTGTACCGAGTGACCGACATCGCTCTCGACCCCTCCACCGCTGTGTACTGGCTAGATGCG
1561 D K R E V E R I S Y N G T N R Q S L F A S P D T P M K L A L
4681 GACAAGCGAGAGGTGACGCGCATCTCTTACAACGGCACTAACCGGCAAGTCTGTTCGCTCTCCGGACACACCAATGAAGCTGGCGCTG
1591 F E H Y V M W M V E A R S T V R Q Q H L D T Y G N V W Q C A
4771 TTTGAACACTACGTTATGTGGATGGTGTGAGGACGCTGCACTGTGCGCCAGCAGCACCTCGACACTAGGCAATGTGTGGCAGTGTGCC
1621 V S G P A A W R C D V I K V H A V A P A T F T V M Q E A N Q
4861 GTCAGGCGCGGCTGATGCGGCTGCGATGATCAAGGTGACGCTGTTGCACTGCTACCTTACCGTATGCAAGAGGCAAAACCAA
1651 E L G G Q S M C D S S C S H L C V S G P A C L A N G T R V R
4951 GAGCTTGGCCAGAGCATGTGCGACAGCTCATGTTTACATCTCTGTGTGTCGGGCGCGGCTGCTCTGCGCCACCGGTACCGGTGTGAGA
1681 T C G Q D C P S M I V G S P I F V T N I P E V P P S P S F L W
5041 ACCGGTCAAGACTGCGCCCTCCATGATCGTGGGTTTACCAGATATTCGTACCAATATCCCTGAGGTTCCCTTCATCTCCGAGCTTCCGTGG
1711 T F F K L V M L T C I I V P I V L G L F V L R Y D I M A L L
5131 ACTTTCTCAAGCTCGTGTGCTAACTGCATCTATTGCGCTATTGTTCTGGTGTGCTGCTTCCGATACGACATCATGGCTGTGCTC
1741 H S C V S A T I N A T S K P V F S N I H F S N P A Y N M G T
5221 CACTCTGTGTGCTGAGTCCCAATCAATGCAACAGCAGCAGCTTTTTCATATTCCTTACGACACCCCGGTACAACATGGGCACG
1771 S H L E T V F H H S R L N P G E H Q Y E N P T T S V C L S D
5311 AGTCACCTGGAGACAGTGTTCACCATTCGCGGCTCAACCGGGGAACCAACCAATACGAGCAACCCACCTTCGCTCTGTCTGTGAGAT
1801 N R T N E S Q L I I S N E V N E I S K D K K V I E F H I N E
5401 AATAGACAAATGAATCACAACATCAATCTCGAATGAAGTGAACGAAATTTCCAAGGATAAAAAAGTATGAGTTTTCATCAACGAA
1831 F V D D D L E Y S E T V G D S H K T P L I K *
5491 TTTGTTGATGACGATTGATAGTCTTGAGTATTCGGAACACTGTGGGAGACTCACACAAGACTCCACTCATCAATAA

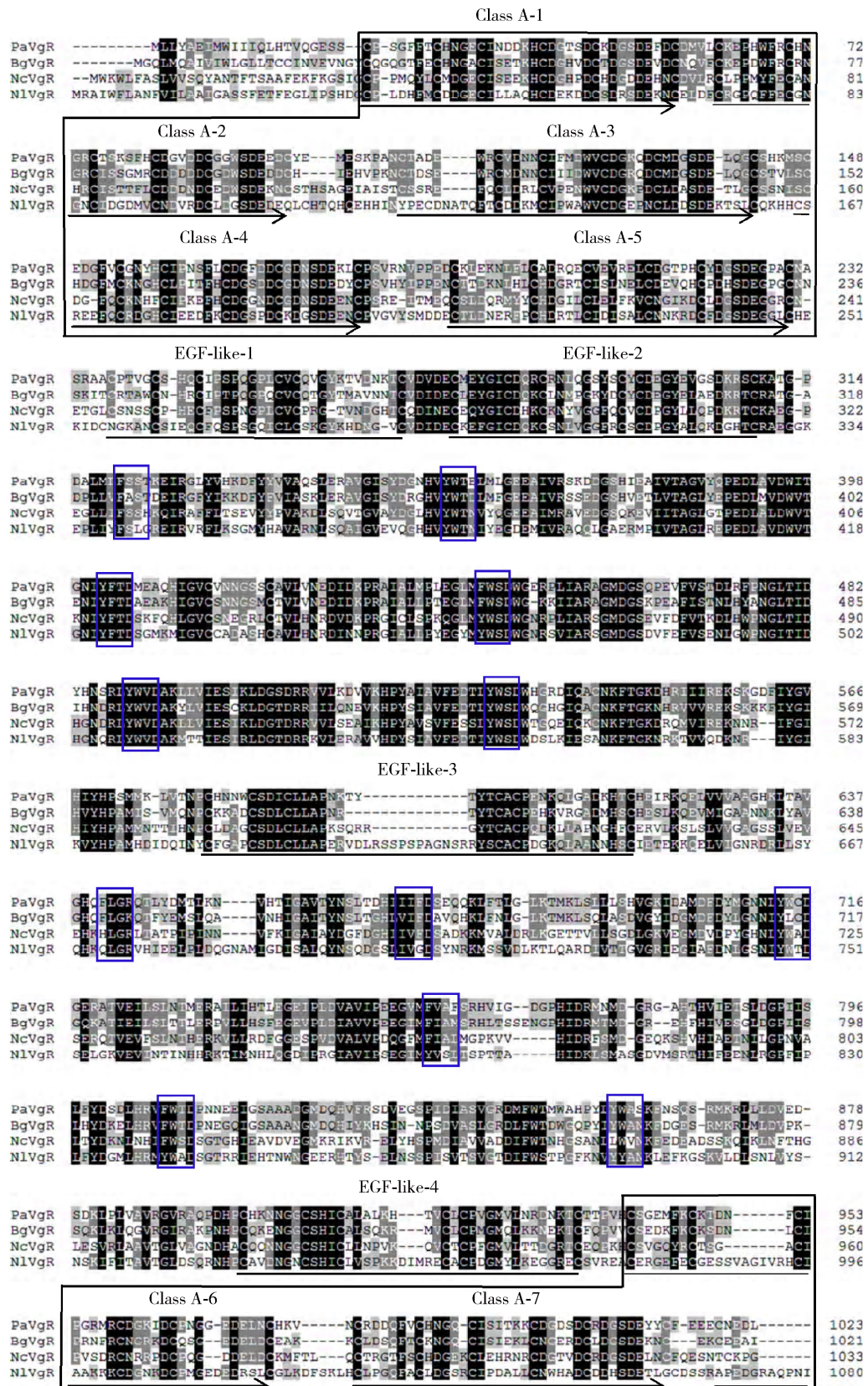
图2 *NcVgR* cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *NcVgR*

划线部分为预测的信号肽,粗线部分为糖基化位点。The putative signal peptide is underlined and glycosylation sites are shown with a bold line.

渐上升,至羽化后 8 d 达到峰值,随后下降。随着黑尾叶蝉产卵,转录水平再次上升,至羽化后 16 d 达到最高水平。另外,*NcVgR* 在卵内亦有微量表达。不同组织中 *VgR* 表达水平如图 7 所示,*NcVgR* 在雌

成虫卵巢中特异性高表达,而在雌成虫脂肪体和肠道中的表达极其微量,在雌成虫脑及雄成虫中均没有表达。



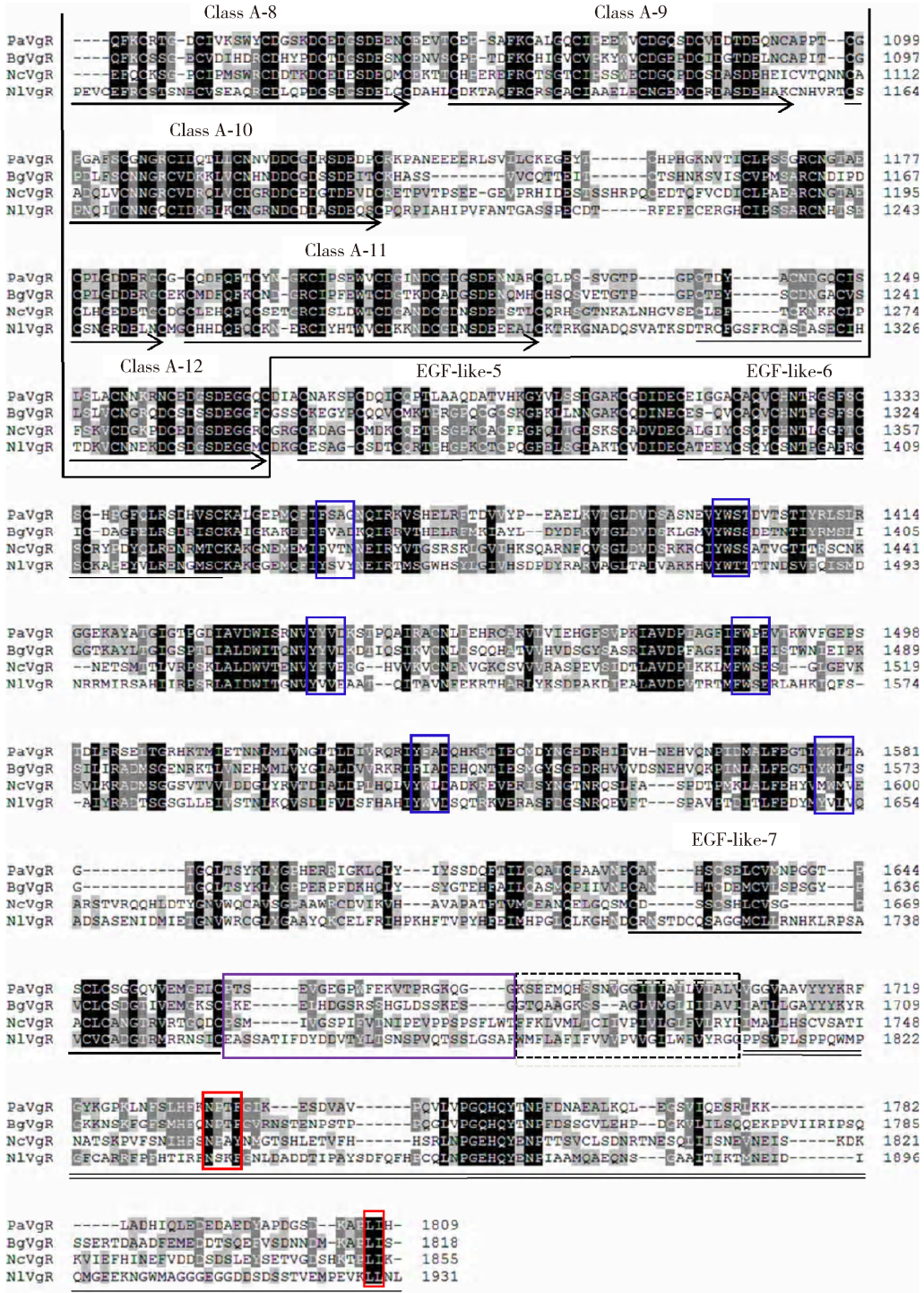


图3 黑尾叶蝉与美洲大蠊、德国小蠊、褐飞虱 VgR 氨基酸多序列比对

Fig. 3 Comparison of the deduced amino acid sequences of NcVgR with VgRs from *Periplaneta americana*,

Blattella germanica and *Nilaparvata lugens*

Pa: 美洲大蠊 *P. Americana*; Bg: 德国小蠊 *B. germanica*; Nc: 黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*; Nl: 褐飞虱 *N. lugens*. 比对采用 Clustal X 1.83 软件 Multiple sequence alignment was performed with Clustal X 1.83. 黑色方框示配体结合域, 黑色直线示表皮生长因子前体同源域, 蓝色方框示形成 β 折叠的 YWXD 基序, 紫色方框示 O-糖链功能域, 黑色虚线框示跨膜域, 黑色双线示胞质尾域, 红色方框示内化信号。黑色、灰色和白色阴影分别表示氨基酸序列保守性为 100%, 80% 和 80% 以下。Ligand binding repeats are framed. EGF-like repeats are underlined. YWXD motifs that form β -propeller domain are framed with blue lines. Putative O-linked sugar domain is indicated with a purple frame. Transmembrane domain is dot-framed. Cytoplasmic domain is double underlined. Internalization signals are framed with red lines. Black, grey and white shades denote the amino acids with 100%, 80% and below 80% identity, respectively.

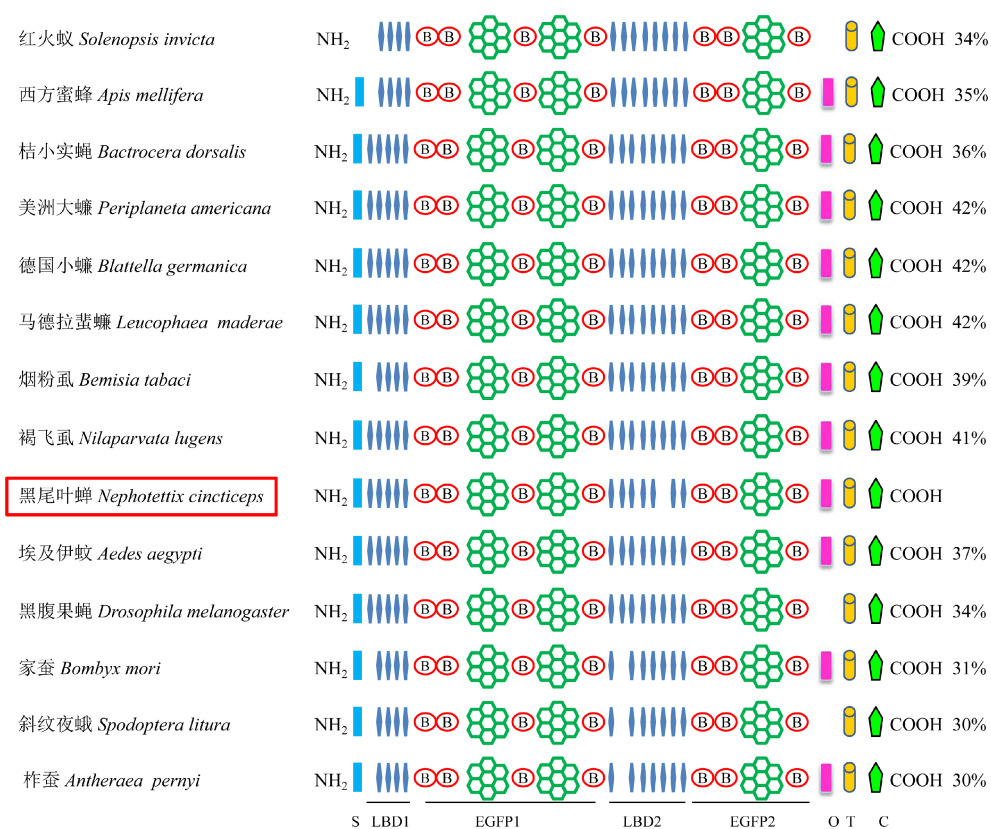


图 4 黑尾叶蝉及其他昆虫 VgR 蛋白质功能同源结构域

Fig. 4 Functional homologs of VgRs of *Nephrotettix cincticeps* and other insects

右边的比例 (%) 表示与黑尾叶蝉 VgR 序列的一致性。The proportions (%) on the right side indicate the overall identity compared with the sequence of *NcVgR*. S: 信号肽 Signal peptide; LBD: 配体结合域 Ligand binding domain; EGFP: 表皮生长因子前体同源域 Epidermal growth factor like domain; O: O-糖链结构域 O-linked sugar domain; T: 跨膜域 Transmembrane domain; C: 胞质尾域 Cytoplasmic domain.

3 讨论

本研究克隆了黑尾叶蝉 *NcVgR* 基因的全长 cDNA,其编码蛋白的序列与其他昆虫 VgR 大小及结构基本一致,具有低密度脂蛋白受体家族的 5 个保守功能域:配体结合域(LBD)、表皮生长因子前体同源域 (EGFP)、O-糖链结构域 (OLSD)、跨膜域 (TMD) 和胞质尾域(Sappington and Raikhel, 1998; Tufail and Takeda, 2009)。NcVgR 含有两个配体结合域,这与其他昆虫 VgR 相同,但是这两个配体结合域分别含有 5 个和 7 个 class A 重复域,这与其他昆虫分别含有 4~5 个和 8 个,或者 4 个和 7 个配体结合域均不相同,且 NcVgR 第 2 个配体结合域中缺少第 6 个 class A 重复域,而其他含有 7 个 class A 重复域的配体结合域均缺少第 2 个 class A 重复域。Class A 重复域含有用于形成分子内二硫键的保守半胱氨酸残基和一些保守酸性残基,这对于受体空间结构的维持至关重要,二硫键的减少及酸性残

基突变均能导致受体无法与配体结合 (Leitersdorf *et al.*, 1990; Sappington and Raikhel, 1998)。黑尾叶蝉与其他昆虫 VgR 配体结构域的不同或许表明黑尾叶蝉在 Vg 内吞作用机理方面具有差异。OLSD 是一个富含丝氨酸和苏氨酸 (S/T) 短的伸展开的链,位于质膜表面。OLSD 并不是昆虫 VgR 所必需的,如黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和红火蚁 *S. invicta* VgR 中就不含该区域 (Schonbaum *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2004; Tufail and Takeda, 2009)。OLSD 的功能还不清楚,其缺失对配体结合、内吞作用及降解均没有影响 (Davis *et al.*, 1986)。NcVgR 具有一个含 30 个残基的 OLSD,该区域的功能还需要进一步研究。胞质尾域位于细胞内部,通过内化信号将受体导向包被小泡。所有 LDLR 家族至少有一个 NPXY 内化信号,昆虫 VgR 具有特殊的 LI 代替 NPXY。NcVgR 胞质尾域同时具有 NPXY 和 LI 两种内化信号,与红火蚁 *S. invicta* VgR 一致 (Chen *et al.*, 2004),这预示着黑尾叶蝉 VgR 内化时可能使用与其他昆虫不同的内化信号。

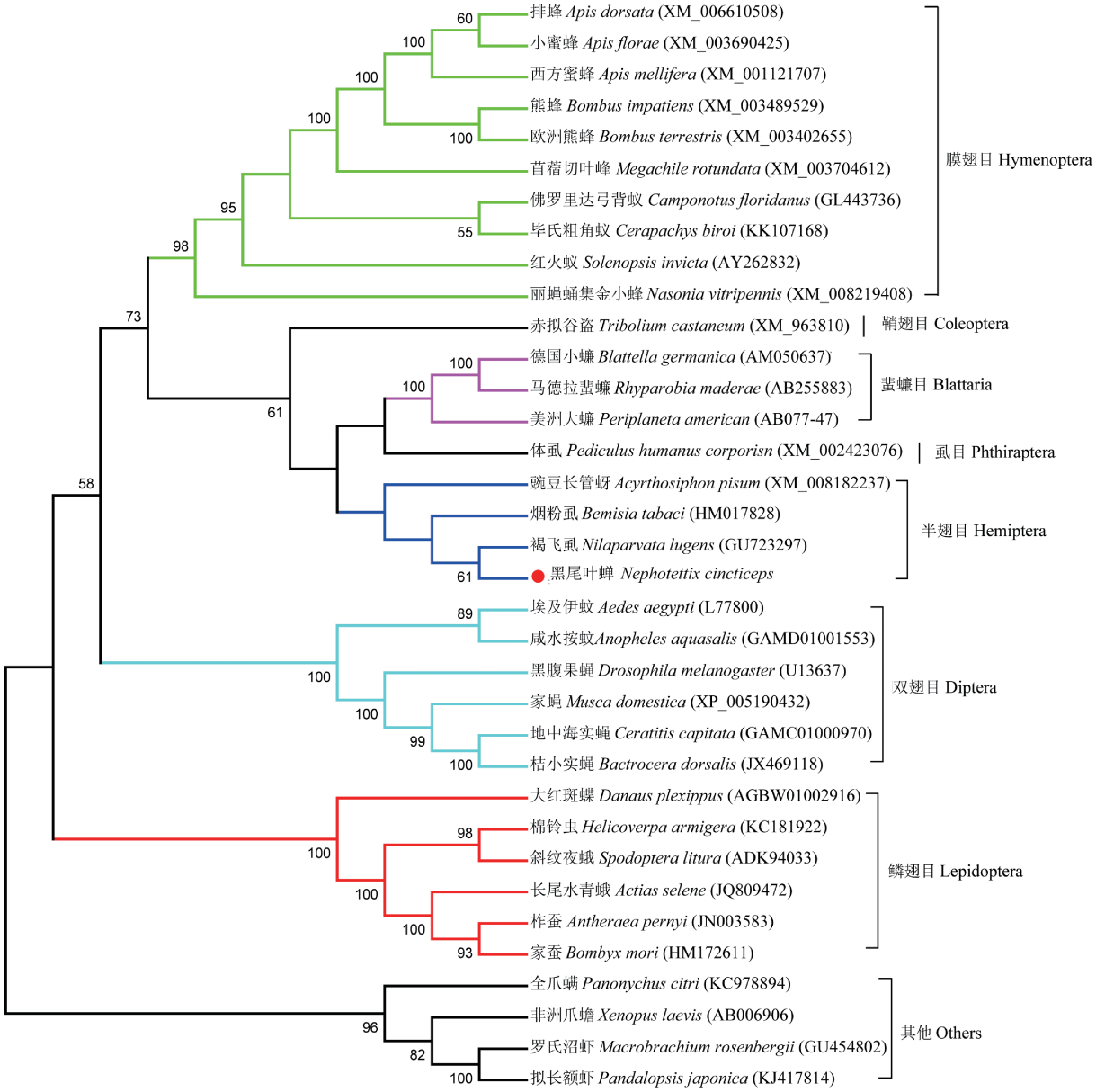


图5 黑尾叶蝉和其他物种 VgR 基因发育进化树构建分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of VgRs in *Nephrotettix cincticeps* and other species

物种名称后为序列的 GenBank 登录号。大于 50% 的 bootstrap 值列于分支上。The GenBank accession numbers are listed after species names. The percentage bootstrap values higher than 50% are marked on each branch.

昆虫 VgR 受体主要在卵黄发生前期大量表达，且蛋白水平比转录水平适当延后。在双翅目中，黑腹果蝇 *D. melanogaster* VgR 转录和蛋白均在卵黄发生前期表达，埃及伊蚊 *A. aegypti* VgR 转录水平在羽化后开始表达，卵黄发生前期和卵黄发生期持续上升。斜纹夜蛾 *S. litura* VgR 从蛹期开始表达，羽化后 36 h 达到最高水平，随后下降并保持在较低水平 (Shu *et al.*, 2011)。在蜚蠊目中，美洲大蠊 *P. americana*、德国小蠊 *B. germanica* 和马德拉蜚蠊 *L. maderae* VgR 的表达模式基本相似，VgR 转录水平

在卵黄发生前期较高，随后下降并保持在较低水平，且 3 种蜚蠊的 VgR 转录水平较高时，蛋白表达相对较低，反之亦然 (Tufail and Takeda, 2005; Ciudad *et al.*, 2006; Tufail and Takeda, 2007)。半翅目褐飞虱 *N. lugens* VgR 转录水平自雌虫羽化后开始迅速上升，羽化 7 d 后达到峰值，随后下降。利用荧光定量 PCR 分析黑尾叶蝉不同时期 VgR 转录表达结果表明，*NcVgR* 转录开始于 5 龄若虫，随后一直上升，至羽化后 8 d 达到峰值，随后下降。随着黑尾叶蝉产卵，转录水平再次上升，至羽化后 16 d 达到最

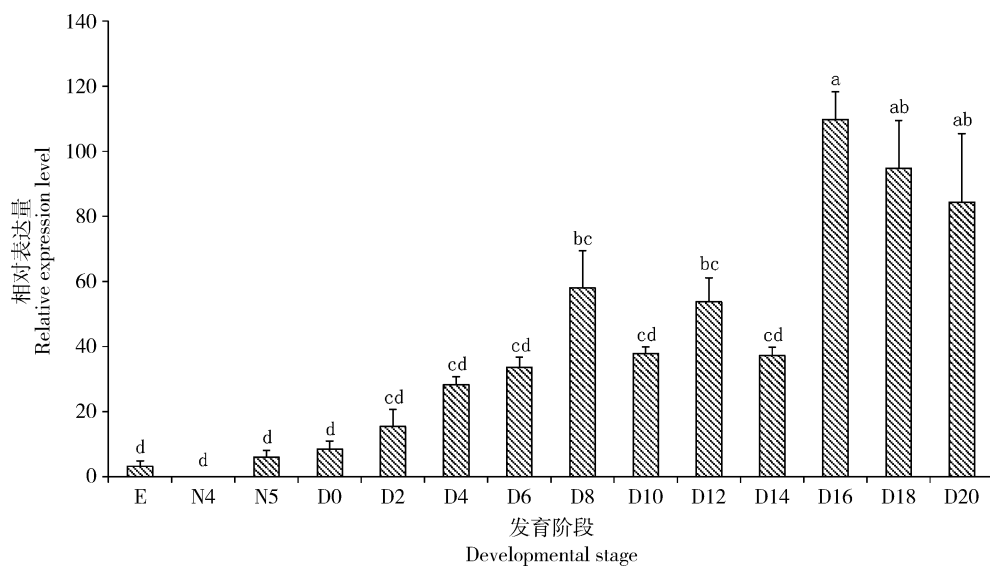


图 6 黑尾叶蝉不同发育时期 *NcVgR* mRNA 转录水平定量分析

Fig. 6 Real-time PCR analysis of *NcVgR* mRNA levels in different developmental stages of *Nephrotettix cincticeps*
E: 卵 Egg; N4: 4 龄若虫 4th instar nymph; N5: 5 龄若虫 5th instar nymph; D0: 刚羽化雌成虫 Newly emerged female adult; D2 – D20: 分别为羽化后第 2 – 20 天的雌成虫 Female adults at 2nd – 20th days after eclosion, respectively. 图中数据为平均值 $\pm$ SE, 每组 3 个生物学重复; 数据分析采用方差分析中 Turkey 氏显著性检验, 柱上不同字母示差异显著 ($P < 0.05$)。Data in the figure are represented as mean $\pm$ SE of three biological replicates in each group. Statistical analyses by ANOVA followed by a Tukey’s multiple comparison test were performed to identify differences between individual means. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

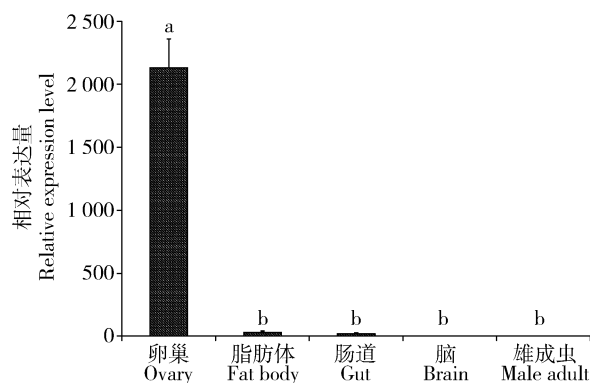


图 7 *NcVgR* 基因在黑尾叶蝉雌成虫组织及雄成虫中的表达检测

Fig. 7 Real-time PCR analysis of *NcVgR* gene in different female adult tissues and male adult of *Nephrotettix cincticeps*
图中数据为平均值 $\pm$ SE, 每组 3 个生物学重复; 数据分析采用方差分析中 Turkey 显著性检验, 柱上不同字母示差异显著 ($P < 0.05$)。Data in the figure are represented as mean $\pm$ SE of three biological replicates in each group. Statistical analyses by ANOVA followed by a Tukey’s multiple comparison test were performed to identify differences between individual means. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

高水平。黑尾叶蝉 Vg 表达同样始于 5 龄若虫, 且在羽化后 12 d 达到峰值, 随后下降, 至羽化后 16 d 达到最高水平 (待发表)。可见, 黑尾叶蝉 VgR 与 Vg 具有类似的表达动态, 这表明黑尾叶蝉 VgR 参与卵黄发生, 但是其 VgR 转录调控的机理仍需进一步探讨。

昆虫 VgR 一般以雌虫卵巢特异性方式表达, 包括黑腹果蝇 *D. melanogaster*、斜纹夜蛾 *S. litura*、红火蚁 *S. invicta*、美洲大蠊 *P. americana*、德国小蠊 *B. germanica* 和马德拉蜚蠊 *L. maderae* 等, 这与其功能是一致的 (Schonbaum *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Tufail and Takeda, 2005, 2007; Ciudad *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2011)。美洲大蠊 *P. americana* VgR 分布在卵巢生殖细胞系表面, 表明 VgR 基因的转录和翻译在生殖区卵母细胞分化之前已经开始 (Tufail and Takeda, 2005)。最近有研究显示, 在桔小实蝇 *B. dorsalis* 卵巢和脂肪体中均检测到 VgR 的转录本及蛋白表达 (Lin *et al.*, 2015); 但也有研究表明, 桔小实蝇 VgR 仅在雌成虫卵巢中表达, 而在其他组织包括脂肪体中均不能检测到 VgR 转录水平 (Cong *et al.*, 2015), 桔小实蝇中脂肪体是否能够表达 VgR, 还需要进一步验证。在柞蚕 *A. pernyi* 和野桑蚕 *B. mandarina* 中, VgR 的转录本在蛹期的卵巢和脂肪体中也能表达, 然而在成虫中, 却仅在卵巢中检测到 VgR 表达 (Liu *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2015)。脂肪体中 VgR 的功能还不清楚, 或许可以将血淋巴中的卵黄多肽吸收至脂肪体作为氨基酸储存, 也可能结合卵黄多肽从而调节其自身表达 (Lin *et al.*, 2015)。红火蚁 *S. invicta* 中未交配的有翅雌成虫 VgR 的转录水平高于交配的蚁后, 但是 VgR 蛋

白水平却低于交配的蚁后,卵母细胞膜上的 VgR 蛋白吸收 Vg 可能作为未交配的有翅雌成虫准备婚飞交配的标志物 (Lu *et al.*, 2009)。西方蜜蜂 *A. mellifera* 中工蜂咽下腺检测有 VgR 的表达,而其转录本在工蜂卵巢、脂肪体、中肠、头及咽下腺中均能检测到,这可能与西方蜜蜂中 Vg 的功能多样性有关 (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008)。除了生殖外,社会性昆虫蜜蜂中 Vg 还参与寿命、社会分工和激素等多方面调节 (Amdam *et al.*, 2004; Guidugli *et al.*, 2005; Corona *et al.*, 2007)。但是同为膜翅目社会性昆虫,红火蚁 *S. invicta* VgR 却只在雌成虫卵巢中表达,雄成虫和雌成虫其他组织均未检测到 VgR (Chen *et al.*, 2004)。

通常 VgR 只在雌虫内表达,参与卵母细胞摄取血淋巴中卵黄原蛋白的内吞作用,而在西方蜜蜂 *A. mellifera* 中,雄蜂和雌蜂中均检测到 Vg 和 VgR 的表达 (Trenczek *et al.*, 1989; Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008)。在黑尾叶蝉雄成虫中,虽然未检测到 VgR 的转录本,但是检测到了 Vg 的转录和蛋白表达 (未发表),雄成虫中 Vg 的作用尚不清楚,可能为生长发育提供营养物质。另外在黑尾叶蝉卵内也检测到 VgR 转录水平,虽然很低,但是相对明显。相同的情况也出现在家蚕 *B. mori* 中,卵中 VgR 的功能尚未揭示,可能与 Vg 作为胚胎发育的营养消耗相关 (Lin *et al.*, 2013)。

黑尾叶蝉是水稻常见害虫,能够传播水稻矮缩病。近年来水稻矮缩病发病面积不断扩大,并有进一步扩散的趋势,目前其防治主要以防治介体昆虫黑尾叶蝉为主 (陈巧云等, 1978; Fujita *et al.*, 2006; 蔡晶等, 2009)。VgR 作为害虫控制的潜在靶标,其研究不仅为探索昆虫 VgR 的生理功能奠定了理论基础,更为发展害虫防治新方法提供了依据。水稻矮缩病毒能够通过介体昆虫黑尾叶蝉传播到子代,前人研究表明,植物病毒可能通过 VgR 介导的内吞作用打破卵巢屏障,完成经卵传播 (Fukushi *et al.*, 1962; Huo *et al.*, 2014),因此 VgR 还可能成为防治水稻矮缩病的潜在靶标,并为揭示水稻矮缩病毒的经卵传播机制提供一个新的方向。

参考文献 (References)

Amdam GV, Simões ZL, Hagen A, Norberg K, Schrøder K, Mikkelsen Ø, Kirkwood TB, Omholt SW, 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.*, 39(5): 767–773.

Boldbaatar D, Battsetseg B, Matsuo T, Hatta T, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Fujisaki K, 2008. Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite. *Biochem. Cell Biol.*, 86(4): 331–344.

Bownes M, 1992. Why is there sequence similarity between insect yolk proteins and vertebrate lipases? *J. Lipid Res.*, 33(6): 777–790.

Cai J, Li XM, Ji ZJ, Ma LY, Yang CD, 2009. Research progress of rice dwarf disease in China. *China Rice*, (1): 10–15. [蔡晶, 李西明, 季芝娟, 马良勇, 杨长登, 2009. 我国水稻普通矮缩病的研究进展. 中国稻米, (1): 10–15]

Chen ME, Lewis DK, Keeley LL, Pietrantonio PV, 2004. cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Mol. Biol.*, 13(2): 195–204.

Chen QY, Jiang JL, Lin H, Zou BX, Tang ZH, 1978. Study on organophosphorus resistance and synergistic mechanism of *Nephotettix cincticeps*. *Acta Entomologica Sinica*, 21(4): 360–368. [陈巧云, 姜家良, 林浩, 邹柏祥, 唐振华, 1978. 黑尾叶蝉对有机磷的抗性及其增效机制的研究. 昆虫学报, 21(4): 360–368]

Cheng L, Guo JY, Liu SS, Ye GY, 2013. Molecular cloning, sequence analysis and developmental expression profile of vitellogenin receptor gene in the whitefly *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 584–593. [程璐, 郭建洋, 刘树生, 叶恭银, 2013. 烟粉虱 MEAM1 隐种卵黄原蛋白受体基因 cDNA 的克隆、序列分析及在不同发育时期的表达. 昆虫学报, 56(6): 584–593]

Ciudad L, Piulachs MD, Bellés X, 2006. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* yolkless mutant. *FEBS J.*, 273(2): 325–335.

Cong L, Yang WJ, Jiang XZ, Niu JZ, Shen GM, Ran C, Wang JJ, 2015. The essential role of vitellogenin receptor in ovary development and vitellogenin uptake in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Int. J. Mol. Sci.*, 16(8): 18368–18383.

Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE, 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(17): 7128–7133.

Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Schneider WJ, Kornfeld S, Brown MS, Goldstein JL, 1986. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 261(6): 2828–2838.

Fujita D, Doi K, Yoshimura A, Yasui H, 2006. Molecular mapping of a novel gene, *Grh5*, conferring resistance to green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 113(4): 567–573.

Fukushi T, Shikata E, Kimura I, 1962. Some morphological characters of rice dwarf virus. *Virology*, 18(2): 192–205.

Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simões ZL, Hartfelder K, 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett.*, 579(22): 4961–4965.

- Guidugli-Lazzarini KR, Nascimento AMD, Tanaka ED, Piulachs MD, Hartfelder K, Bitondi MG, Simoes ZL, 2008. Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *J. Insect Physiol.*, 54 (7): 1138 – 1147.
- Herren JK, Paredes JC, Schüpfer F, Lemaitre B, 2013. Vertical transmission of a *Drosophila* endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery. *mBio*, 4(2): e00532.
- Huo Y, Liu WW, Zhang FJ, Chen XY, Li L, Liu QF, Zhou YJ, Wei TY, Fang RX, Wang XF, 2014. Transovarial transmission of a plant virus is mediated by vitellogenin of its insect vector. *PLoS Pathog.*, 10(3): e1003949.
- Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH, 1990. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J. Clin. Invest.*, 85(4): 1014 – 1023.
- Liang L, Guo JY, Tian JC, Chen Y, Hu C, Ye GY, 2010. Effects of rice dwarf virus on ovarian development and fecundity of the green leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Fabricius). *Acta Phytophylacica Sinica*, 37(4): 375 – 376. [梁莉, 郭建洋, 田俊策, 陈洋, 胡萃, 叶恭银, 2010. 水稻矮缩病毒对黑尾叶蝉卵巢发育与产卵量的影响. 植物保护学报, 37(4): 375 – 376]
- Lin WJ, Chien CY, Tsai CL, Chen ME, 2015. A nonovary-specific vitellogenin receptor from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 90(4): 169 – 180.
- Lin Y, Meng Y, Wang YX, Luo J, Katsuma S, Yang CW, Banno Y, Kusakabe T, Shimada T, Xia QY, 2013. Vitellogenin receptor mutation leads to the oogenesis mutant phenotype “scanty vitellin” of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 288(19): 13345 – 13355.
- Lin Y, Zhao P, Hou Y, Li J, Gong DP, Sun Q, Xia QY, Xiang ZH, 2005. Vitellogenin and vitellogenin receptor gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Zoologica Sinica*, 51(1): 117 – 125. [林英, 赵萍, 侯勇, 李娟, 龚达平, 孙全, 夏庆友, 向仲怀, 2005. 家蚕卵黄原蛋白及其受体基因. 动物学报, 51(1): 117 – 125]
- Liu QN, Zhu BJ, Liu CL, Wei GQ, Wang ZG, 2011. Characterization of vitellogenin receptor (VgR) from the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Bull. Insectol.*, 64(2): 167 – 174.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.
- Lu HL, Vinson SB, Pietrantonio PV, 2009. Oocyte membrane localization of vitellogenin receptor coincides with queen flying age, and receptor silencing by RNAi disrupts egg formation in fire ant virgin queens. *FEBS J.*, 276(11): 3110 – 3123.
- Lu K, Shu Y, Zhou J, Zhang X, Chen M, Yao Q, Zhou Q, Zhang W, 2015. Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stål). *J. Insect Physiol.*, 73: 20 – 29.
- Mitchell RD, Ross E, Osgood C, Sonenshine DE, Donohue KV, Khalil SM, Thompson DM, Roe RM, 2007. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(4): 375 – 388.
- Qian C, Fu WW, Wei GQ, Wang L, Liu QN, Dai LS, Sun Y, Zhu BJ, Liu CL, 2015. Identification and expression analysis of vitellogenin receptor from the wild silkworm, *Bombyx mandarina*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 89(4): 181 – 192.
- Ruan YL, Chen SX, Jin DD, 1985. Occurrence dynamic and chemical control of vector of rice drawf virus, *Nephotettix cincticeps*. *Entomological Knowledge*, 22(2): 54 – 57. [阮义理, 陈声祥, 金登迪, 1985. 传播水稻病毒病的介体黑尾叶蝉发生动态及化学防治. 昆虫知识, 22(2): 54 – 57]
- Sappington TW, Hays AR, Raikhel AS, 1995. Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(7): 807 – 817.
- Sappington TW, Raikhel AS, 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(5 – 6): 277 – 300.
- Schonbaum CP, Lee S, Mahowald AP, 1995. The *Drosophila* yolkless gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(5): 1485 – 1489.
- Schonbaum CP, Perrino JJ, Mahowald AP, 2000. Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Mol. Biol. Cell*, 11(2): 511 – 521.
- Shu YH, Wang JW, Lu K, Zhou JL, Zhou Q, Zhang GR, 2011. The first vitellogenin receptor from a lepidopteran insect: molecular characterization, expression patterns and RNA interference analysis. *Insect Mol. Biol.*, 20(1): 61 – 73.
- Smith AD, Kaufman WR, 2013. Molecular characterization of the vitellogenin receptor from the tick, *Amblyomma hebraeum*, (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(12): 1133 – 1141.
- Snigirevskaya ES, Sappington TW, Raikhel AS, 1997. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. *Cell Tissue Res.*, 290(1): 175 – 183.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254 – 260.
- Trenczek T, Zillikens A, Engels W, 1989. Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 35(6): 475 – 481.
- Tufail M, Takeda M, 2005. Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Insect Mol. Biol.*, 14(4): 389 – 401.
- Tufail M, Takeda M, 2007. Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(3): 235 – 245.
- Tufail M, Takeda M, 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.*, 54(12): 1447 – 1458.
- Tufail M, Takeda M, 2009. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.*, 55(2): 88 – 104.
- Yoshida S, Forno DA, Cock J, 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 61 – 66.